

## 4-アミノアゾベンゼンメトキシ誘導体の代表的発癌 活性化に関する研究

著者	渡辺 宏
号	118
発行年	1981
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/15634">http://hdl.handle.net/10097/15634</a>

氏 名 (本籍)      わた 渡      なべ 辺      ひろし 宏

学 位 の 種 類      薬      学      博      士

学 位 記 番 号      薬 博 第      1 1 8      号

学位授与年月日      昭和 5 6 年 1 2 月      9 日

学位授与の要件      学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専門課程      東北大学大学院薬学研究科  
(博士課程) 薬学専攻

学 位 論 文 題 目      4-アミノアゾベンゼンメトキシ誘導体  
の代表的発癌活性化に関する研究

(主 査)

論文審査委員      教授 橋 本 嘉 幸      教授 鶴 藤      丞

教授 鈴 木 康 男

## 論文内容要旨

本研究は芳香族第1級アミン型化合物である4-アミノアゾベンゼン(AAB)メトキシ誘導体の発癌活性発現について代謝的な面から解明する目的で行なった。

AABメトキシ誘導体はメトキシ(MeO)基の位置の違いにより肝臓に対する発癌活性が異なる。AABは弱発癌性物質であり、アミノ基のオルト位にMeO基のある3-MeO-AABは強発癌性物質である。一方、アミノ基のメタ位にMeO基のある2-MeO-AABは非発癌性物質である。また、4'-MeO-AABは中発癌性物質であり、2,5-diMeO-AABは精子形成阻害作用があり、副腎髄質癌を誘起するが、肝癌は決して誘起しない性質の物質である。

一般に、発癌性物質はdirect carcinogenとprecarcinogenとに分類される。precarcinogenは生体内で代謝的に活性化されDNAと結合し、遺伝的制御を崩すことにより何らかの変化をもたらす、それが発癌につながるものと考えられている。発癌性芳香族アミンは一般にprecarcinogenであり、代謝的にアミノ基がN水酸化を受けて、更に水酸基が硫酸や酢酸などの抱合化を受けて活性化されると考えられている。

そこで、著者はN-ヒドロキシアミノアゾベンゼン(N-OH-AAB)メトキシ誘導体及びその酢酸抱合体の合成を試みた。N-OH-AAB及び、2-MeO-, 3-MeO-, 4'-MeO-, 2,5-diMeO-の全てのN水酸化誘導体を合成することができた。酢酸抱合体では3-MeO-誘導体はNMR測定では合成できたことを確認したが、非常に不安定で単離できなかった。一方、2-MeO-誘導体は3-MeO-誘導体よりも比較的安定で容易に合成単離することができた。

Knudsonら及び、Bonaiti - Pellieらにより発癌は遺伝子の突然変異であるという仮説が立てられている。近年、Amesら及び杉村らはサルモネラ菌を用いた発癌性物質の突然変異原性について研究した結果、突然変異原性と発癌性は試験した化合物の8割以上が一致することが明らかになった。Amesテストではpremutagenの検出の為に検体をラット肝酵素(S-9)とあらかじめ一定時間、37℃でインキュベートし、その後に菌とインキュベートして変異活性を測定している。

そこで、著者らはAABメトキシ誘導体を中心としたアゾ色素についてサルモネラ菌に対する突然変異原性について調べた。その結果、AABメトキシ誘導体はS-9とインキュベートしない場合、すなわちS-9(-)では変異活性はどの化合物も示さなかったが、S-9(+)では発癌性のAABメトキシ誘導体は全て変異活性を示した。以上のように、AABメトキシ誘導体はPremutagenであり、S-9(+)でのその変異活性は発癌活性とほぼ一致した。

サルモネラ菌を用いた突然変異原試験には限界がある。例えばN-メチル-4-アミノアゾベンゼン(MAB)は強力な発肝癌性アゾ色素であるが、S-9(+)での変異活性はほとんど示さな

い。

そこで、著者は初代培養肝細胞を用いて、Precarcinogenの不定期DNA 合成誘起 (UDS) 試験を行った。肝細胞は活性化酵素を十分に保持し、かつ、DNA はその細胞の中に存在し、生成した活性体は効率よく細胞内のDNA と結合していくと考えられる。また、成熟した肝細胞は99 %以上がS 期以外の周期に属し、定期DNA 合成、すなわち複製DNA 合成はほとんど行なわれていない。UDS 活性とは化合物がDNA に損傷を与えた場合、細胞のS 期以外の周期において修復した DNA 合成量のことを意味する。すなわち、そのDNA 合成量は一緒にインキュベートした [ $^3\text{H}$ ] Thimidine の核への取込み量で測定される。また、取込み量はオートラジオグラフィにより細胞核上の黒化粒子の数で表わされる。ラット肝細胞におけるAABメトキシ誘導体のUDS活性はその発癌活性とはほぼ定量的に一致した。ラットはWistar系、ACI/N系、及び、Donryu系の3系統のものをを用いた。その結果、系統間にはUDS 活性の差は認められなかった。マウス肝細胞を用いた場合、AABとOATはラット肝細胞での活性よりも著しく強いUDS 活性を示した。しかし、同一化合物のUDS 活性は用いたマウスの性における差は認められなかった。

3-MeO-AABの活性体と推定されるN-OH-3-MeO-AABはAmesテストにおいてS-9(-)でもS-9(+)でも変異活性は非常に強かった。更に、UDS 活性では、N-OH-3-MeO-AABは3-MeO-AABよりも経時的にはUDS 活性は速く極大に達する。また、他の発癌性AABメトキシ誘導体のN水酸化体のS-9(-)での変異活性もプラスであり、UDS 活性も母化合物の活性よりも強いことから、N-OH-AABメトキシ誘導体がAABメトキシ誘導体の活性体であると考えられる。

そこで、著者らは活性体の発癌試験を行ない、活性体を一層明確にすることにした。3-MeO-AAB及びN-OH-3-MeO-AABを用い、検体をオリーブオイルに懸濁させ、マウス背皮下部に週2回、8週間注射した。13カ月間観察した結果、N-OH-3-MeO-AABを投与した群では性を問わず、投与部位に肉腫が形成された。一方、3-MeO-AABを投与した群には肉腫は全く認められなかった。以上のことから、N-OH-3-MeO-AABは3-MeO-AABの発癌活性体であることが証明された。すなわち、AABメトキシ誘導体の発癌活性化としてN水酸化反応が重要な代謝過程であると考えられる。

また、果して肝臓内ではAABメトキシ誘導体のN水酸化酵素は存在するのかどうかを明らかにするために、AABメトキシ誘導体をPCBで酵素誘導処理したラット肝ミクロゾームとインキュベートした。その結果、AABメトキシ誘導体からN水酸化誘導の生成することをMassスペクトルやその他の化学的性質から明らかにすることができた。

また、Amesテストにおいて、N-OH-AABメトキシ誘導体の合成原料である4-ニトロアゾベンゼン(NAB)メトキシ誘導体はdirect mutagenであることがわかった。すなわち、NABメト

キシ誘導体の中で、3-MeO-NAB, 4'-MeO-NAB, NAB, 及び 2,5-diMeO-NAB はS-9(-)で変異活性を示した。一方、2-MeO-NAB はS-9(-)で変異活生を示さなかった。しかし、S-9(+)では全てのNABメトキシ誘導体の変異活性はプラスであった。このように、ニトロ化合物は芳香族第1級アミン型化合物とはまた異なった活性化機構があると考えられる。また、ニトロ化合物と菌体とをインキュベートすることにより、N水酸化誘導体を検出し、その量を定量した。その結果、その化合物の変異活性の強さとN水酸化誘導体の生成量とは相関せず、全てのNABメトキシ誘導体からN水酸化誘導体が菌体のニトロ還元酵素により生成することが明らかになった。以上のことから、AABメトキシ誘導体の発癌活性化は発癌性物質である4NQOの活性化と同じではないかと考えた。

そこで、著者らは多田らの協力を得て、多田らの開発したアミノアシル-tRNA合成酵素による活性化のシステムを用いて、N-OH-AABメトキシ誘導体の活性化について調べた。その結果、N-OH-AABメトキシ誘導体はそのままではDNAと反応せず、アミノアシル-tRNA合成酵素により活性化されDNAと反応することが明らかになった。また、N-OH-MABの誘導体ではこの酵素によっては活性化されないことがわかった。以上のことから、AABメトキシ誘導体は代謝的に発癌活性化されるには最初に、N水酸化され、後にアミノアシル化されることにより活性化され、その活性体が生体内のDNAと結合し、何らかの遺伝的制御を崩し発癌がもたらされるものと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

4-アミノアゾベンゼンのメトキシル誘導体はラットに於ける癌原性とその構造との関係が知られている。本研究はこの構造-活性相関がどのような因子によって支配されているかを明らかにすることを目的に行われた。そのための手段としては癌原性とよく相関することが知られているサルモネラ菌に対する変異原性及び初代培養肝細胞に対する不定期DNA合成(UDS)誘起活性の試験が行われた。

まずアミノアゾベンゼンの活性体と考えられているN-水酸化体を各種メトキシル誘導体において合成し母化合物と併せて試験材料とした。

母化合物のアミノ体はS-9の存在下で定性的にはそれらの発癌性と並行する変異原性を示した。またN-水酸化体はS-9の存在なしに変異原性を示すことが明かにされた。

次に各化合物のUDS誘起活性がしらべられた結果、ラット肝に対しては癌原性と相関する結果が得られた。またN-水酸化体は一般に母化合物よりも高い活性を示すこと、またそのUDS誘起速度も速いことが明かにされた。

これらの試験においてラットに対し癌原性の強い3-メトキシ-4-アミノアゾベンゼン(3-MeO-AAB)及びそのN-水酸化体は両者いずれの試験でも高い活性を示すが、非癌原性の2-メトキシル体及びそのN-水酸化体には全く活性のないことが特徴的であった。そこで両者のN-水酸化体のマウスにおける癌原性を皮下投与によって検索した。その結果、2-メトキシル体は癌原性を示さないことが認められた。

以上の結果は芳香族アミンの一つである4-アミノアゾベンゼンをモデルとして現在、癌原性試験法として多用されているサルモネラ菌による癌原性試験及び初代培養肝細胞を用いたUDS試験の有用性と問題点を示す研究として評価され、またこれら化合物の癌原性、変異原性及びUDS誘起活性と化学構造との相関を示す研究としても価値があるものと考えられ、博士論文として充分評価し得るものとする。